

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460169

研究課題名(和文) 医薬品による発がんリスク増加に関わる輸送担体の探索とその評価系の開発

研究課題名(英文) Development of assay system for increase of cancer risk by carcinogenesis-modifying compounds via inhibition of efflux-transporters.

研究代表者

関本 征史 (Sekimoto, Masashi)

麻布大学・その他部局等・准教授

研究者番号：10381732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では発がん修飾物質の作用点として発がん性物質の細胞内動態に着目して検討を行った。その結果、ある種の医薬品(ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬)や食品成分(クルクミン)が異物排泄トランスポーター、特にBCRPの機能を阻害することで、発がん性物質の細胞内濃度を増加させ、その生理作用を増強していることが示唆された。

また、発がん性化学物質の体内動態を予測できる重層モデル実験系の作成に成功した。これを用いて、発がん性化学による遺伝毒性の変化を解析することにより、発がん修飾物質の作用機序の解析や検索に大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)： In this study, we examined the enhancing effects of carcinogenesis-modifying compounds such as pharmaceutical products and drug transporter inhibitors on the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-mediated physiological function such as arylhydrocarbon receptor (AhR) activation and CYP1A1 induction. The intracellular level of PAHs and its physiological functions were increased by the nicardipine (dihydropyridine calcium channel blockers), curcumin (food components) and specific inhibitors of breast cancer resistant protein (BCRP).

In addition, we succeeded in new assay systems that could predict the absorption from the intestinal tract and toxicological effects of carcinogens. This assay system is useful for screening and analysis of mechanism of carcinogenesis-modifying compounds.

研究分野：環境衛生学

キーワード：発がん性物質 複合影響 遺伝毒性 BCRP CYP1A1 AhR HepG2 Caco-2

1. 研究開始当初の背景

長期間の服用が予想される医薬品や、あるいは食品中化学物質の安全性評価において、その発がんリスクの評価は重要な課題である。これまでに上市された医薬品のなかには、遺伝毒性試験や動物実験では発がん性が認められていないにもかかわらず、服用患者において発がんリスクの増加が認められ、結果として使用が中止となった例が知られている。すなわち、これら医薬品は、それ自身が発がん性を持たないが、間接的に発がんリスクを増加させる「発がん修飾物質」である可能性が考えられる。

ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬 (DHP-CCB) は、高血圧治療薬の第一選択薬として広く用いられている。研究代表者らは、DHP-CCB が発がん性物質の代謝活性化に重要とされるシトクロム P4501A 酵素 (CYP1A 酵素) を誘導することに着目し、発がん性芳香族炭化水素の一種である 3-メチルコランスレン (MC) の発がんイニシエーションに及ぼす DHP-CCB の影響をヒト肝がん HepG2 細胞を用いて検討した。その結果、発がん性 (イニシエーション活性やプロモーター活性) を持たない DHP-CCB が、発がん性芳香族炭化水素 (PAH) 類の細胞内濃度を増加させるとともに、その代謝活性化を亢進させることで遺伝子傷害性を増強することを見いだした (*Cancer Sci.* 101, 652, 2010)。

この結果は、自身が発がん性を持たない医薬品が、発がん修飾物質として働き、発がんイニシエーション活性を増加させる可能性を示すものと思われた。

2. 研究の目的

新規開発医薬品の安全性評価において、その発がんリスクを予測することは必須の課題である。現在、発がんリスクを予測する試験として、遺伝毒性試験、短期発がん試験、あるいは長期投与の発がん性試験などが行われている。しかし、本研究で対象とする「発がん修飾物質」については、発がん剤と修飾物質の組み合わせが無数にあることもあり、その検討がほとんど行われておらず、試験法も確立されていない。そこで本研究では、その存在が疑われる「発がん修飾物質」について、特にイニシエーション過程における増強作用に着目し、「発がん修飾物質」の「発がん性物質の細胞内動態に及ぼす修飾作用」という観点から解析を試みることにした。(Fig.1)

まず、DHP-CCB が発がん性 PAH 類の細胞内蓄積を増加させることに着目し、DHP-CCB をモデル化合物として用いて、発がん性 PAH 類の細胞内取込み・排泄に関わる輸送担体 (トランスポーター) を探索した。さらに、輸送担体の機能阻害 (または発現低下) に伴

って発がんイニシエーション作用 (DNA 損傷性) が増強するか否かを実験的に検証した。さらに、ヒトでのリスク評価を踏まえ、発がん性物質の in vivo 体内動態を模倣した新規モデル細胞実験系の構築を試みた。

発がん修飾物質によるイニシエーション作用の増強機構を
発がん性物質の細胞内動態の観点から解析する

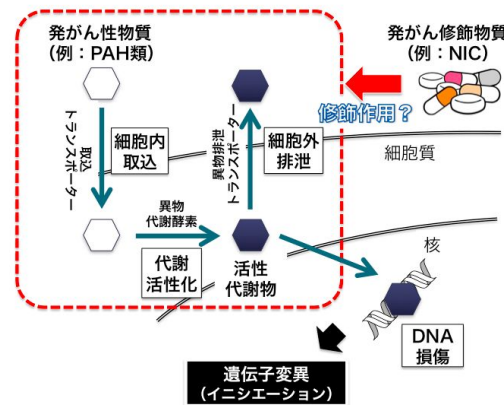


Fig.1. 本研究の概念図

3. 研究の方法

1) 試験化合物: 発がん性物質あるいはその類縁化合物として、3-メチルコランスレン (MC)、ベンゾ[a]ピレン (BaP)、7,12-ジメチルアントラセン (DMBA)、β-ナフトフラボン (BNF)、インディゴ (IND)、2-アミノ-α-カルボニトリル (AaC) および 1,4-ジメチル-5H-ピリド[4,3-b] インドール-3-アミン (Trp-P-1) を使用した。発がん修飾候補化合物として、DHP-CCB であるニカルジピン (NIC) と食品成分であるクルクミン (CUR) を、また、多剤耐性トランスポーターの阻害剤としてベラパミル (Ver)、MK571、Ko143 および Ko134 を使用した。

2) 試験細胞株: ヒト肝がん細胞株 HepG2、大腸がん細胞株 Caco-2、肺がん細胞株 A549、乳がん細胞株 MCF-7、子宮がん細胞株 Hela および Ishikawa を使用した。また、HepG2 細胞および A549 細胞に AhR レポーター遺伝子をそれぞれ安定に発現させることで作成した AhR ルシフェラーゼレポーター細胞株 (HepG2-XL24、HepG2-A10 もしくは A549-XL を作成して使用した (*Genes Environ.*, 29: 11-16, 2007))。

3) 芳香族炭化水素受容体 (AhR) 標的分子発現量の測定: 試験細胞株を 48 時間前培養した後、MC と被検化合物 (NIC および多剤耐性トランスポーターの阻害剤) を複合処理した。一定時間経過後に細胞を回収し、AhR 標的遺伝子 (CYP1A1 および CYP1B1) の発現量を定量的 RT-PCR 法により、また、CYP1A タンパク質発現量を Western Blot 法により、それぞれ測定した。

4) AhR 活性化能の測定: AhR ルシフェラーゼレポーター細胞株を 48 時間前培養した後、AhR 活性化物質と被検化合物 (NIC、CUR および多剤耐性トランスポーターの阻害剤) を複合処理した。24 時間後に細胞を回収し、AhR 活性を Luciferase assay により測定した。さらに、細胞溶解液のタンパク質濃度を測定し、タンパク質当たりの活性として算出した。

5) 細胞内 MC 量の測定: HepG2-A10 細胞に [³H]-MC と被検化合物 (NIC および多剤耐性トランスポーターの阻害剤) を複合処理した。6 時間後の細胞内 [³H]-MC を液体シンチレーションカウンターにより測定した。さらに、細胞溶解液のタンパク質濃度を測定し、タンパク質当たりの活性として算出した。

4. 研究成果

発がん性 PAH 類による発がん性は、PAH 類の細胞内への取込み、AhR の活性化に伴った PAH 代謝活性化酵素である CYP1 酵素の誘導、CYP1 酵素により活性化された PAH 代謝物による DNA 付加体の形成、という過程により発揮されると考えられる。

この PAH 類の細胞外排泄には、P-糖タンパク質 (P-gp) や Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) などの多剤耐性トランスポーターが関与することが示されていること、DHP-CCB は P-gp や Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) を機能的に阻害することがそれぞれ知られている。そこでまず、HepG2 細胞に対して多剤耐性トランスポーターの特異的阻害剤 (P-gp; ペラパミル、BCRP; Ko143) と PAH 類の一種である MC を 12 時間複合処理し、MC の細胞内濃度および CYP1A 酵素誘導に及ぼす影響を評価した。

その結果、いずれの阻害剤を処理した場合にも細胞内 MC 量および AhR 活性化能の増加が見られたが、その程度は BCRP 阻害剤の作用が最も大きかった (Fig.1A)。また、BCRP 阻害剤存在下、MC による CYP1A 酵素の誘導が著しく増強された (Fig.1B)。このことから、発がん性芳香族炭化水素化合物 (MC) の細胞内濃度維持に肝異物排出トランスポーターの一種である BCRP が重要な役割を果たしていることが示唆された。

さらに、どのような化合物が、どのような発がん性物質の作用を増強するか、その特徴付けを試みた。ここでは、前出の NIC や BCRP 阻害剤 (Ko143、Ko134) に加え、研究代表者が発がん修飾候補物質として見いだしている食品成分クルクミン (CUR) を用いた。ヒト AhR レポーター細胞株である HepG2-A10 に対し、これら化合物を発がん性 PAH (MC、BaP、DMBA)、非発がん性 AhR リガンド (BND、IND)、発がん性芳香族アミン (Trp-P-1、MeAaC) などと同時処理し、その複合影響を AhR を指標として解析した。

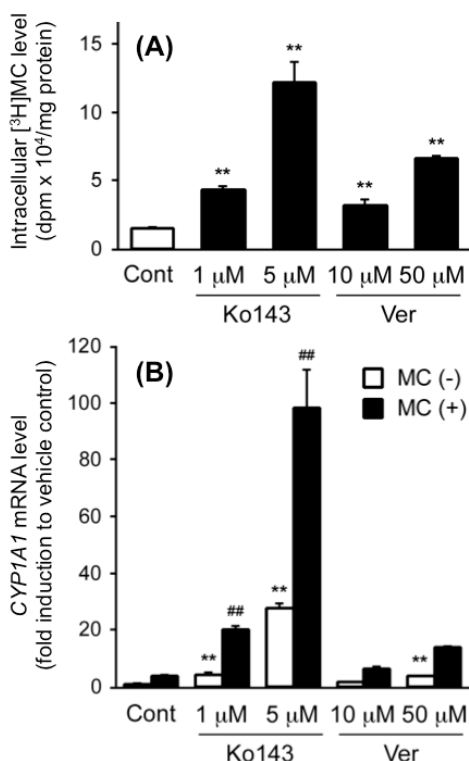


Fig.2. MCの細胞内濃度およびCYP1A1遺伝子発現に対するトランスポーター阻害剤の影響

その結果、NIC、CUR および BCRP 阻害剤はいずれも 3-MC と IND によるヒト AhR 活性化を相乗的に増強した。また、BaP による AhR 活性化に対しては CUR が、BNF による AhR 活性化に対しては NIC のみがそれぞれ増強作用を示した。一方、DMBA、AaC および Trp-P-1 による AhR 活性化に対しては、どの化合物も活性化増強作用を示さなかった (Table 1)。これらの結果より、NIC や CUR は BCRP 阻害剤と類似の機構により、ある種の発がん性物質や AhR 活性化剤の細胞内濃度を増加させ、複合影響を示すことが示唆された。

Table 1 発がん修飾候補物質によるAhR活性化の増強効果

	NIC (10 μM)	CUR (10 μM)	Ko143 (5 μM)	Ko134 (10 μM)
MC (0.1 μM)	+++	+	+++	+++
BaP (1 μM)	+	++	+	+
DMBA (1 μM)	±	±	±	±
BNF (1 μM)	+	±	±	±
IND (10 μM)	++	+	++	+++
Trp-P-1 (1 μM)	±	±	±	+
AaC (10 μM)	±	±	±	+

+++、++、+、±; AhR活性化剤単独処理に対する増強の強さを表す

そこで、これら異物排出トランスポーターの発現阻害による影響を試みた。HepG2 細胞に対して各トランスポーターの siRNA を処理により、標的とするトランスポーターの発現を低下させることには成功したが、非特異的な影響や、代償的に標的以外のトランスポーターの発現増加などがみられた。そこで、

CRISPER/Cas9 システムによるトランスポーター発現欠損細胞の樹立を試みたが、DNA 二重鎖切断に伴った細胞死の惹起がみられたものの、残念ながら遺伝子欠損細胞の樹立には至らなかった。

次に、これらの複合影響が細胞腫特異的であるかを、種々ヒト細胞株を用いて検討した。HepG2 のほか、Caco-2、A549、MCF-7、Hela および Ishikawa の各細胞株に対し、MC (0.1 μ M) と NIC (10 μ M) を複合処理し、24 時間後の CYP1 酵素遺伝子 (*CYP1A1*, *CYP1B1*) の発現量を測定した。今回用いた細胞のうち、MCF-7 における *CYP1A1* の誘導は特に顕著であった。また、A549 および Hela 細胞を除く他の細胞において、NIC は低濃度 MC による AhR 標的遺伝子の発現を増強した (Table 2 および 3)。

Table 2 各細胞でのCYP1A1 mRNA発現量

	MC (0.1 μ M)	NIC (10 μ M)	MC +NIC	MC (1 μ M)
HepG2	2.8	5.1	14.7	9.4
A549	1.6	1.0	2.5	4.8
Caco-2	1.9	3.6	10.4	11.2
MCF7	6.4	7.9	75.1	265.0
Hela	2.6	2.5	5.5	16.8
Ishikawa	4.4	3.1	10.2	18.6

Table 3 各細胞でのCYP1B1 mRNA発現量

	MC (0.1 μ M)	NIC (10 μ M)	MC +NIC	MC (1 μ M)
HepG2	0.8	7.4	6.6	3.8
A549	2.0	1.8	2.6	2.1
Caco-2	1.6	2.3	7.6	10.0
MCF7	3.4	2.5	4.3	6.3
Hela	1.1	1.8	2.6	3.2
Ishikawa	1.9	1.2	4.8	6.7

そこで、HepG2 と A549 細胞由来 AhR レポーター細胞株を用いて AhR 活性化を解析したところ、NIC は低濃度 MC による AhR 活性化を HepG2 由来細胞では増強したが、A549 由来細胞では増強しなかった (Fig. 2)。これらの結果から、A549 細胞では NIC による AhR 活性化増強作用が喪失している可能性が示唆される。

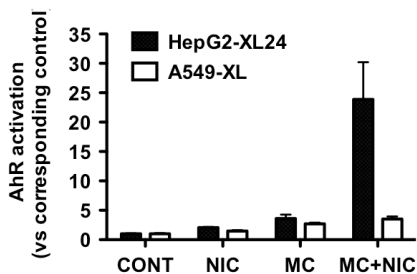


Fig.3. HepG2およびA549細胞での AhR活性化におけるMCとNICの増強効果

A549 細胞での異物排出トランスポーターの遺伝子発現プロファイルは HepG2 と若干異なるものの、BCRP の発現低下は報告されていないことから、BCRP とは異なる分子が、Nic による MC の作用増強に関わっている可能性も示唆された。

最後に、大腸がん細胞 Caco-2 を半透膜 (MilliCell: ミリポア社) 上に播種し、28 日間培養することで、分化した Caco-2 細胞層を形成させた。さらにその下層に播種した HepG2 細胞をセットし、発がん性物質の消化管吸収を反映させた重層モデル実験系を構築した (Fig.4)。

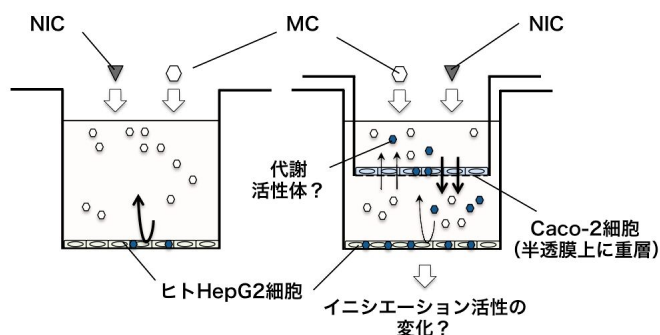


図4. 発がん物質のin vivo体内動態を模倣した新規モデル細胞実験系

Caco-2 細胞の有無により MC の作用や NIC との複合影響が変化するかを解析した。まず、Caco-2 の上部 (apical 側) から NIC (10 μ M) と MC (1 μ M) を 24 時間処理した。これは、apical 側と下部 (basal 側) の培地量を考えると、対照群 (Caco-2 なし) ではそれぞれ、NIC (3.3 μ M) と MC (0.33 μ M) に相当する。さらに、それぞれの HepG2 細胞における AhR 標的遺伝子発現量 (*CYP1A1*) を指標として比較検討した。

その結果、HepG2 細胞単独では、NIC は MC による *CYP1A1* 遺伝子発現を顕著に増強したが、重層モデルにおいては、MC による誘導はほぼ消失し、さらに、NIC による誘導増強作用も見られなくなった (Fig.5)。

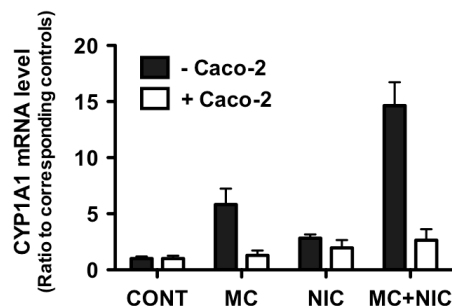


図5. 新規モデル細胞実験系における AhR標的遺伝子誘導の確認

このことから、比較的低濃度の発がん物質の曝露があっても、その多くは腸管膜からの吸収を受けないか、あるいは腸管から管腔側に排泄されるために、肝臓などの基底膜側に存在する組織にはほとんど影響を及ぼさないことが示唆された。なお、今回の重層モデルを用いた検討からは、NICとMCの複合曝露を行っても、基底膜側に播種したHepG2での顕著な遺伝子発現変動は認められなかったが、実際にラットを用いた検討では、肝臓、肺、腎臓などの諸臓器において、NICはMCによるCYP1酵素遺伝子の発現を増強することを確認している。

以上、本研究では発がん修飾物質の作用点として発がん性物質の細胞内動態に着目して検討を行なった。その結果、ある種の医薬品や食品成分が異物排泄トランスポーターの機能を阻害することで、発がん性物質の細胞内濃度を増加させ、その生理作用を増強していることが示唆された。

また、発がん性化学物質の体内動態を予測できる重層モデル実験系の作成に成功した。これを用いて、遺伝子発現変動のみならず、実際に遺伝毒性の変化が見られるかを解析することにより、発がん修飾物質の作用機序の解析や検索に大きく貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)
なし

[学会発表](計7件)

- 1) Masashi Sekimoto, Takuomi Hosaka, Ayaka Kamoshita, Masakuni Degawa: Augmentation of AhR-mediated Induction of CYP1A Subfamily Enzymes by Nicardipine in Human Hepatoma-derived Cell Lines and Rat Tissues. The 8th International Congress of Toxicology (Seoul, Korea)、要旨集、2013年7月2日
- 2) Masashi Sekimoto, Takuomi Hosaka, Ryota Uchiyama, Ayaka Kamoshita, Masakuni Degawa: Nicardipine enhanced AhR-mediated CYP1 family enzyme expressions in rat tissues and in human HepG2 cells. 32th Annual Meeting on Environmental Pollutants; Chalk Talk 2013-Korea/Japan Joint Meeting on Environmental Pollutants- (Seoul, Korea)、要旨集、2013年7月5日
- 3) Masashi Sekimoto, Seiko Fujii, Ryota Uchiyama, Masakuni Degawa: Effects of

efflux-transporter inhibitors on the chemical-mediated activation of aryl hydrocarbon receptor in a human cell line HepG2-A10. 第18回 静岡健康・長寿学術フォーラム(静岡) 要旨集 p.53、2013年11月1日

- 4) 関本征史、出川雅邦：シンポジウム「環境・衛生分野の若手が切り開く異物代謝・毒性学：分子機構解明における新展開」化学物質複合曝露による生体への影響？：異物代謝酵素の誘導および活性阻害の観点から。第134回日本薬学会年会(熊本) 2014年3月30日
- 5) 関本征史、保坂卓臣、吉成浩一、出川雅邦：リガンドを介したAhR活性化に及ぼすBCRP阻害の影響。日本環境変異原学会第34回大会(東京) 2014年12月4日
- 6) 関本征史、吉成浩一、出川雅邦：シンポジウム「次世代研究者セミナー：薬物の安全性評価における新たな挑戦」化学物質の複合曝露による細胞毒性発現：AhR活性化を指標として。第42回日本毒性学会学術年会(金沢) 2015年7月1日
- 7) 関本征史、田野辺潤、成瀬理紗、山下夏木、遠藤治、出川雅邦：高血圧治療薬Nicardipineによる芳香族炭化水素受容体(AhR)活性化増強作用。第43回日本毒性学会学術年会(名古屋) 2016年6月29日(発表予定)

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]
ホームページ等
公開なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

関本 征史 (SEKIMOTO, Masashi)
静岡県立大学・薬学部講師 (~2014年9月)
麻布大学・生命・環境科学部・准教授
(2014年10月~)
研究者番号：10381732

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし